

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 27 JUL 2004

WIPO PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung
einer Patentanmeldung**

Aktenzeichen:

103 31 517.9

Anmeldetag:

11. Juli 2003

Anmelder/Inhaber:Graffinity Pharmaceuticals AG,
69120 Heidelberg/DE**Bezeichnung:**

Sensoranordnung

IPC:

G 01 N 21/55

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. Mai 2004
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Ebert

Graffinity Pharmaceuticals AG
Heidelberg

5

Sensoranordnung

Die vorliegende Erfindung betrifft eine Sensoranordnung für optische Messanordnungen, Verfahren zur Herstellung der Sensoranordnung sowie Verfahren zur Aufbringung von Flüssigkeitsproben auf eine Sensoranordnung.

10

Ein aktueller Ansatz zur Wirkstoffsuche besteht darin, eine große Anzahl diverser chemischer Verbindungen mittels automatisierter Syntheseapparaturen zu erzeugen. Diese Vielzahl an unterschiedlichen Strukturen wird dann auf Bindung mit Interaktionspartnern, die häufig Biomakromoleküle wie Proteine darstellen, getestet. Ein automatisiertes Verfahren, das auf diese Weise eine große Zahl von Proben sichtet, wird auch als High Throughput Screening bzw. Hochdurchsatz-Screening bezeichnet.

20

Aufgrund der biologischen Streuung der Messergebnisse bei Bindungsstudien ist es dabei besonders wichtig, für sämtliche Verbindungen beim Bindungstest exakt dieselben Bedingungen zu realisieren. Daher sollte der Test im Idealfall für sämtliche Proben möglichst gleichzeitig und mit derselben Lösung des zu untersuchenden Interaktionspartners durchgeführt werden, um Alterungseffekte und Temperaturdriften sowie unterschiedlich lange Bindungszeiten für die Verbindungen auszuschließen. Aufgrund der aufwendigen Verfahren zur Aufreinigung von Biomakromolekülen sollten die für den Test benötigten Mengen möglichst gering gehalten werden.

25

30

Neben der Parallelisierung der Messung ist eine Miniaturisierung der Mess- oder Sensorfelder in der Messvorrichtung von großer Bedeutung, um die Anzahl der Sensorfelder und deren Dichte zu erhöhen und so durch die Parallelisierung der Messung nicht nur zu vergleichbareren Ergebnissen sondern auch zu einer drastischen Erhöhung der Anzahl der Messungen pro Zeiteinheit zu gelangen.

Hierbei eingesetzte Methoden basieren häufig auf optischen Messverfahren. Neben optischen Verfahren, die ein Durchstahlen der Probe erfordern, sind reflexionsoptische Verfahren bekannt, die Strahlung, die zumindest teilweise an einer Grenzschicht reflektiert wurde, zur Untersuchung der Probe heranziehen.

Eine dieser reflexionsoptischen Methoden ist die Interferometrie, speziell für Bindungsuntersuchungen wird die Reflektometrische Interferenzspektroskopie (RIfS) verwendet.

Eine weitere, besonders effektive Methode zur Durchführung von Bindungstests ist die Oberflächenplasmonenresonanz-Spektroskopie (abgekürzt SPR, von englisch: Surface Plasmon Resonance). Bei SPR wird ein Interaktionspartner (z.B. Ligand) auf einer Metalloberfläche immobilisiert und dessen Bindung an einen anderen Interaktionspartner (z.B. Rezeptor) nachgewiesen. Dazu wird ein optischer Träger (meist ein Prisma) mit Gold beschichtet und der Intensitätsabfall des intern im Prisma reflektierten Lichtes als Funktion des eingestellten Winkels oder als Funktion der Wellenlänge detektiert (Kretschmann-Anordnung). Nachgewiesen wird letztendlich eine Brechungsindexänderung des Mediums auf der der Goldschicht gegenüberliegenden Seite, die auftritt, wenn Moleküle an die Oberfläche binden.

Fig. 1a zeigt schematisch die sogenannte Kretschmann-Geometrie, die vielfach zur Messung des SPR-Effektes benutzt wird. Hier wird eine auf einem Prisma 1.20 befindliche dünne Goldschicht 1.2 mit der zu untersuchenden Lösung 1.5 in benetzenden Kontakt gebracht. Auf der Goldschicht immobilisierte Liganden tragen das Bezugszeichen 1.3, während mögliche Interaktionspartner in der Lösung das Bezugszeichen 1.4 tragen. Gemessen wird üblicherweise die Intensität des intern an den Grenzschichten Glas/Gold/Flüssigkeit reflektierten Lichtes entweder als Funktion des Einfallswinkels ϑ oder als Funktion der Wellenlänge λ . Bei geeigneter Resonanzbedingung nimmt die Intensität des reflektierten Lichtes stark ab. Die Energie des Lichtes wird dann umgewandelt in Elektronen-Ladungsdichtewellen (Plasmonen) entlang der Grenzschicht Gold/Flüssigkeit. Die Resonanzbedingung lautet näherungsweise (aus Kapitel 4, "Surface Plasmon Resonance" in G. Ramsay, Commercial Biosensors, John Wiley & Sons (1998):

$$\frac{2\pi}{\lambda} n_{prism} \sin \vartheta \approx \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{n_{metal}^2(\lambda) n_{sample}^2}{n_{metal}^2(\lambda) + n_{sample}^2}}$$

Dabei ist n_{prism} der Brechungsindex des Prismas, n_{metal} der komplexe Brechungsindex der Metallschicht und n_{sample} derjenige der Probe. ϑ und λ sind Einfallswinkel und Wellenlänge des eingestrahlteten Lichtes. Die Wellenlängenspektren (Fig. 1b) beziehungsweise die Winkelspektren (Fig. 1c) zeigen eine Abnahme der Intensität in dem Wellenlängenbereich beziehungsweise in dem Winkelbereich, bei dem die oben aufgeführte Resonanzbedingung erfüllt ist. Durch Veränderung des Brechungsindex in der Lösung n_{sample} wird die

- Resonanzbedingung verändert, wodurch sich die Resonanzkurven verschieben. Der Wert der Verschiebung ist für kleine Veränderungen im Brechungsindex linear zu dieser Änderung (für größere Änderungen kann nötigenfalls eine Kalibrierung erfolgen). Da das reflektierte Licht nur wenige 100 nm in die Flüssigkeit eindringt, wird lokal in diesem Bereich die Brechungsindexänderung gemessen. Wenn die in der Lösung befindlichen Zielmoleküle (z.B. Proteine) 1.4 an geeignete Interaktionspartner 1.3, die auf der Oberfläche immobilisiert sind, binden (d.h. sich ein Assoziations-Dissoziationsgleichgewicht einstellt), erhöht sich lokal die Konzentration des Zielmoleküls an der Oberfläche, die dann als Brechungsindexänderung nachgewiesen werden kann.
- 15 Um die Eingangs erwähnten Bestrebungen zur Parallelisierung und Miniaturisierung erfüllen zu können, ist es wünschenswert eine Vielzahl von Sensorfeldern auf einem Substrat bereitzustellen.
- 20 Die einzelnen Sensorfelder sollten durch lichtabsorbierende Bereiche voneinander getrennt werden, wobei diese Trennung z.B. durch absorbierende Lacke realisiert werden kann. Sinn dieser lichtabsorbierenden Bereiche ist es, einen Kontrast zu erzeugen, der es bei der Abbildung der Sensoranordnung auf einen ortsauflösenden Detektor erlaubt, die Bildbereiche den Sensorfeldern zuordnen zu können.

Ein solches Substrat 2.10 mit Sensorfeldern 2.15 und Trennmitteln 2.16 ist in Fig. 2a gezeigt. Dieses Substrat 2.10 wird dann mittels einer Indexanpassungsschicht 2.11 (z.B. Indexanpassungsöl) auf ein Prisma 2.12 gesetzt. Über das Prisma 2.12 kann dann Strahlung eingekoppelt werden, die im geeigneten Winkelbereich auf die Sensorfelder auftreffen

kann, sowie die reflektierte Strahlung wieder ausgekoppelt werden (siehe Fig. 2b). Dem Prisma 2.12 ist eine Abbildungsoptik (nicht abgebildet) nachgeordnet, welche die reflektierte Strahlung auf einen geeigneten Sensor, z.B. einen CCD-Chip wirft. Dies ist schematisch in Fig. 2c gezeigt, wo die Zuordnung zwischen den Sensorflächen 2.15 und entsprechenden Pixelbereichen 2.17 auf dem CCD-Sensor 2.510 abgebildet ist.

10 WO-A-01/63256 offenbart solche lichtabsorbierenden Bereiche als Trennmittel, wobei als geeignete Materialien absorbierende Metall- oder Halbleiterschichten oder Polymere (z.B. Photolack, Silizium) vorgeschlagen werden. Hierbei sollen die Trennmittel eine Dicke von 10 bis 5000 μm aufweisen.

Die Erhöhung der Dichte der Sensorfelder führt dazu, dass die Fläche der Sensorfelder kleiner wird. Bei dem Versuch, kompakte Sensoranordnungen mit Photolack als Trennmittel herzustellen, zeigten sich die folgenden Schwierigkeiten:

- Die geometrische Dicke des Lackes von einigen μm erzeugt eine Kante, die aufgrund der Oberflächenspannung der Messlösung Gasbläschen an diesen Kanten hervorruft. Offenbar stellt das Aspektverhältnis Schichtdicke:Durchmesser dabei eine Rolle, da dieser Effekt bei größeren Feldern nicht beobachtet wurde. Auch der Zusatz von Benetzungsverbessern schafft hier keine zuverlässige Abhilfe. Dies ist in Fig. 3 gezeigt. Hier ist schematisch der Querschnitt durch eine Sensoranordnung gezeigt, wobei 3.3 das Substrat bezeichnet, 3.2 die Photolackschicht, die als Trennmittel eingesetzt wird, und 3.1 die Messlösung. In den freien Bereichen

zwischen den Trennmitteln 3.2 befinden sich die Sensorfelder. In einigen dieser Bereiche sind Gasbläschen 3.4 gefangen.

- Bei der Strukturierung von dicken Schichten (dick bedeutet hier die Größenordnung $10\mu\text{m}$ oder etwas darüber) vermindert sich die Kantenqualität, d.h. wird der Lack häufig unterwandert, wie in Fig. 4 gezeigt. 4.1 bezeichnet hierbei eine Photomaske für die Strukturierung eines Lacks 4.2 auf einem Substrat 4.3. Die unterwanderten Bereiche 4.5, die sich unter Vorständen 4.4 befinden, werden später bei der Goldbedampfung nicht mit Metall beschichtet und führen bei der späteren Messung in der SPR-Meßapparatur zur Totalreflexion, und verschlechtern somit das SPR-Signal.

Die Verwendung von dünneren Lackschichten ist nicht möglich, da dann kein ausreichender Kontrast zwischen den Sensorfeldern und den Trennbereichen geschaffen wird.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, eine funktionsfähige Sensoranordnung der oben beschriebenen Art bereitzustellen, deren Sensorfelder durch Trennmittel abgegrenzt sind, die in wesentlich geringerer Dicke gegenüber den im Stand der Technik bekannten Trennmitteln gebildet werden können, vorzugsweise mit einer Dicke kleiner als $1\mu\text{m}$.

Diese Aufgabe wird durch die Merkmale des Patentanspruchs 1 bzw. die Gegenstände der nebengeordneten Ansprüche gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind Gegenstand der abhängigen Ansprüche.

Erfindungsgemäß ist eine die Trennbereiche bildende Trennmittelschicht zumindest in einem ersten Bereich, der an die Grenzfläche zwischen der Trennmittelschicht und dem

Substrat grenzt, so ausgebildet, dass an der Grenzfläche zwischen der Trennmittelschicht und dem Substrat eine Reflektivität kleiner 0,5 bewirkt wird. Ferner ist die Trennmittelschicht zumindest in einem zweiten Bereich, der
5 über dem ersten Bereich auf der dem Substrat abgewandten Seite liegt, so ausgebildet, dass eine Extinktion größer 0,95 bewirkt wird.

Die beiden Bereiche können Teil einer einheitlichen Schicht
10 sein, oder durch zwei verschiedene, übereinander vorgesehene Schichten bereitgestellt werden.

Durch das Schaffen einer Reflektivität von kleiner 0,5 an der Grenzfläche und gleichzeitig die Erzielung einer Extinktion
15 von größer 0,95 in dem Bereich darüber, kann ein ausreichender Kontrast zwischen den Trennmitteln und den Sensorflächen geschaffen werden, selbst bei geringer Schichtdicke. Durch die erfindungsgemäße Ausbildung der Trennmittelschicht mit den zwei genannten Bereichen ist es
20 insbesondere möglich die Dicke der Trennmittelschicht so zu verkleinern, dass die oben genannten Probleme nicht auftreten. Damit ist es wiederum möglich Sensoranordnungen zu schaffen, welche eine große Dichte an Sensorfeldern haben, z.B. größer als 250 Felder pro cm^2 .

25 Durch die Sensoranordnungen mit hoher Sensorfelddichte können effiziente Hochdurchsatzmessungen mit Sensorplatten, die beispielsweise etwa 10000 Felder tragen, durchgeführt werden, deren Gesamtfläche weniger als 20 cm^2 beträgt, im Gegensatz
30 zu herkömmlichen Sensorplatten, die bei gleicher Feldanzahl um ein bis zwei Größenordnungen größer sind. Durch die großen Flächenabmessungen bei herkömmlichen Sensorplatten sind die zugehörigen optischen Messanordnungen (d.h. Linsensysteme) sehr groß, d.h. es sind Linsen mit Durchmessern größer 15 cm
35 notwendig, sowie entsprechend große Linsenabstände von bis zu mehreren Metern. Damit sind die herkömmlichen Messanordnungen sehr teuer, da die optischen Komponenten speziell angefertigt

werden müssen, und sehr unpraktisch, da die Anordnungen ganze Räume einnehmen.

Demgegenüber ist es mit den Sensoranordnungen mit hoher
5 Sensorfelddichte möglich, eine kompakte optische
Messanordnung einzusetzen, welche aus handelsüblichen
Optikkomponenten aufgebaut sein kann, und welche bequem auf
einem Labortisch Platz findet.

10 Ein weiterer Vorteil der hohen Felddichte liegt im
reduzierten Bedarf an in Lösung befindlichen Zielmolekül, wie
Protein. Gerade die Menge an verfügbarem Protein stellt
häufig eine kritische Größe dar.

15 Die vorliegende Erfindung wird nun anhand von bevorzugten
Ausführungsformen beschrieben, wobei auf die Figuren Bezug
genommen wird, in welchen:

20 Fig. 1 schematisch eine SPR-Messanordnung und
charakteristische Resonanzkurven zeigt;

Fig. 2 eine Sensorplatte mit Sensorfeldern und
Trennbereichen zeigt;

25 Fig. 3 die Problematik der Gasblasenbildung bei
herkömmlichen Sensoranordnungen veranschaulicht;

Fig. 4 die Problematik der Unterätzung bei herkömmlichen
Sensoranordnungen veranschaulicht;

30 Fig. 5 graphisch den Zusammenhang zwischen Brechungsindex,
Extinktionskoeffizient und Reflektivität
veranschaulicht;

35 Fig. 6 schematisch ein Verfahren zur Herstellung einer
Sensoranordnung zeigt;

Fig. 7 Reflektivitätsmessungen an erfindungsgemäßen
Sensoranordnungen zeigt;

Fig. 8 SPR-Messungen an erfindungsgemäßen Sensoranordnungen zeigt;

Fig. 9 Reflektivitätsspektren für Siliziumschichten zeigt;

Fig. 10 Reflektivitätsspektren für Titan und Zweischichtsysteme aus Titan und Silizium zeigt;

Fig. 11 schematisch den Querschnitt durch eine Anordnung von Übertragungstiften zeigt, welche dafür vorgesehen sind Flüssigkeitsproben auf die Sensorfelder einer Sensoranordnung aufzubringen;

Fig. 12 schematisch die Übertragung von Flüssigkeitsproben auf Sensorfelder zeigt;

Fig. 13a eine Perspektivansicht einer Sensoranordnung zeigt; und

Fig. 13b und 13c schematische Querschnittsansichten von Ausführungen der Trennmittelschicht nach der vorliegenden Erfindung.

Nun wird anhand der Figur 13 eine Ausführung der vorliegenden Erfindung beschrieben. Es sei erwähnt, dass die Ausführung in Zusammenhang mit SPR beschrieben wird, was auch eine bevorzugte Anwendung der Erfindung ist. Die Erfindung ist jedoch nicht auf SPR beschränkt, da die erfindungsgemäßen Sensoranordnungen für alle Messsysteme eingesetzt werden können, in welchen Reflektionsmessungen an Sensorfeldern durchgeführt werden.

Die Sensoranordnung 13.1 umfasst ein strahlungsleitendes Substrat 13.9, das eine erste und eine zweite Oberfläche aufweist. Die erste Oberfläche 13.2 ist eine Strahlungsdurchtrittsfläche, durch welche Strahlung eines vorgegebenen Wellenlängenbereichs in das Substrat 13.9 eingekoppelt bzw. aus dem Substrat 13.9 ausgekoppelt werden

kann. Diese Strahlungsdurchtrittsfläche wird typischerweise mittels einer Indexanpassungsschicht mit einem Prisma verbunden, wie in Fig. 2 gezeigt, sofern das Prisma nicht selbst das Substrat darstellt. Durch das Prisma wird
 5 Strahlung zum Substrat 13.9 geführt bzw. von ihm weggeführt.

Im Beispiel der Fig. 13 ist die Sensoranordnung als flaches Plättchen ausgeführt, was zwar bevorzugt ist, aber nicht zwingend.

10

Für SPR-Messungen an Goldoberflächen kann der interessierende Wellenlängenbereich im langwelligen Bereich des sichtbaren Spektrums bis hin in das Nah-Infrarot liegen, beispielsweise zwischen 500 und 1500 nm liegen.

15

Auf der zweiten Oberfläche 13.3 ist eine Vielzahl von Sensorfeldern 13.4 vorgesehen, welche ausgebildet sind, um aus dem Substrat 13.9 kommende Strahlung des vorgegebenen Wellenlängenbereichs, die in einem vorbestimmten
 20 Winkelbereich einfällt, zu reflektieren. Diese Sensorfelder sind z.B. mit Gold (siehe 13.6 in Fig. 13b) oder einem anderen SPR-geeigneten Material beschichtete Bereiche, in welchen Oberflächenplasmonen angeregt werden können. Für SPR-Messungen auf Goldoberflächen kann der interessierende
 25 Winkelbereich zwischen 55 und 80 Grad liegen.

Für RIFS dient eine chemisch modifizierte Glasoberfläche als Sensorfeld, der Winkel für die Reflexion ist hier deutlich kleiner als bei SPR.

30

Auf der zweiten Oberfläche 13.3 sind ferner Trennbereiche 13.5 zur Trennung der einzelnen Sensorfelder 13.4 von den jeweils benachbarten Sensorfeldern 13.4 vorgesehen. Die Trennbereiche 13.5 sind ausgebildet aus dem Substrat 13.9
 35 kommende Strahlung des vorgegebenen Wellenlängenbereichs, die in dem vorbestimmten Winkelbereich einfällt, zu absorbieren, um in der an den Sensorfeldern 13.4 reflektierten Strahlung

einen Kontrast zwischen den Sensorfeldern 13.4 und den Trennbereichen 13.5 zu erzeugen.

Die Trennbereiche 13.5 sind durch eine Trennmittelschicht 13.10 (siehe Fig. 13b) auf der zweiten Oberfläche 13.3 des Substrats 13.9 gebildet. Dabei bewirkt die Trennmittelschicht 13.10 zumindest in einem ersten Bereich 13.8, der an die Grenzfläche zwischen der Trennmittelschicht 13.10 und dem Substrat 13.9 grenzt, für aus dem Substrat kommende Strahlung des vorgegebenen Wellenlängenbereichs, die in dem vorbestimmten Winkelbereich einfällt, an der Grenzfläche zwischen der Trennmittelschicht 13.10 und dem Substrat 13.9 eine Reflektivität kleiner 0,5, vorzugsweise kleiner 0,25.

Gleichzeitig bewirkt die Trennmittelschicht 13.10 zumindest in einem zweiten Bereich 13.7, der über dem ersten Bereich 13.8 auf der dem Substrat 13.9 abgewandten Seite liegt, für Strahlung des vorgegebenen Wellenlängenbereichs eine Extinktion von größer 0,95.

Durch die Reflektivität von kleiner 0,5 wird bewirkt, dass an den Trennbereichen höchstens 50% der einfallenden Strahlung reflektiert wird, während an den Sensorfeldern (außerhalb der SPR-Resonanz) eine Reflektivität von annähernd 1 herrscht.

Durch die Extinktion zumindest im zweiten Bereich, vorzugsweise in der gesamten Schicht 13.10, wird verhindert, dass nennenswerte Strahlungsmengen durch die Schicht 13.10 transportiert werden, an der Oberseite der Schicht reflektiert werden, und dann nach dem erneuten Durchlaufen der Schicht wieder in das Substrat 13.9 gebrochen werden. Somit wird insgesamt gewährleistet, dass ein guter Kontrast zwischen den Trennbereichen und den Sensorfeldern geschaffen wird.

Der erste und der zweite Bereich 13.7, 13.8 können zu einer einheitlichen Schicht 13.10 gehören. In diesem Fall besteht die Schicht 13.10 aus einem Material, das sowohl die

geforderte Reflektivität als auch die geforderte Extinktion erzielen kann. Die Reflektivität hängt im wesentlichen von den Brechungsindices der sich an der Grenzfläche begegnenden Materialien, die Extinktion vom Extinktionskoeffizienten des Materials der Trennmittelschicht ab. Dabei ist aber zu beachten, dass der Extinktionskoeffizient der Imaginärteil des komplexen Brechungsindex des Trennmittelmaterials ist, also auch bei der Reflektivität eingeht.

- 10 Zunächst betrachte man die Einstellung der Reflexion: Bei der Reflexion von Licht an der Grenzfläche zwischen zwei Medien unterschiedlichen Brechungsindices (n_0 : Brechungsindex auf der einfallenden Seite, also das Substrat 13.9, n_1 : Brechungsindex des Mediums in dem das Licht gebrochen wird, also die Trennmittelschicht 13.10) gibt es für p-
- 15 polarisiertes Licht den sogenannten Brewsterwinkel, bei dem das Licht vollständig in das Medium eindringt, die Reflexion also verschwindet (siehe Fig. 5a).

- 20 Formelmäßig ist der Brewsterwinkel folgendermaßen aus den Werten der Brechungsindices berechenbar: $\tan(\theta_B) = n_1 / n_0$.

- Bei SPR-Messungen verwendet man p-Polarisiertes Licht. Sieht man den SPR-Winkel θ_{SPR} aus den restlichen experimentellen Bedingungen gegeben an, und gibt man den Brechungsindex des Substrates n_0 vor, so ist der Brechungsindex der Trennmittelschicht n_1 optimal zu wählen als
- 25

$$n_1 = n_0 \tan(\theta_{SPR})$$

30

Dann dringt also sämtliches Licht in die Trennmittelschicht ein.

- Allerdings ist die Physik an der Grenzfläche zwischen zwei Medien, bei denen eines der Medien absorptive Eigenschaften hat, d.h. einen nicht verschwindenden
- 35

Extinktionskoeffizienten, auf die obige Weise nicht korrekt beschrieben.

Korreakterweise muss die Fresnelsche Formel für die Reflexion von p-polarisiertem Licht herangezogen werden. Demnach beträgt das Amplitudenverhältnis von reflektiertem Licht zu einfallendem Licht:

$$r = \frac{\tan(\theta_0 - \theta_1)}{\tan(\theta_0 + \theta_1)}$$

und daraus ergibt sich der Reflexionskoeffizient:

$$R = rr^*$$

Wobei θ_0 der Einfallswinkel und θ_1 der Winkel des gebrochenen Strahls ist. Der Einfallswinkel ist der SPR-Winkel und der Winkel des gebrochenen Strahls ergibt sich aus dem Brechungsgesetz.

$$n_0 \sin(\theta_0) = n_1 \sin(\theta_1)$$

Bei einem Material mit Extinktion (z.B. Metallen) ist dann n_1 komplex, d.h.

$$n_1 = n_{1r} - i\kappa$$

wobei n_{1r} der reelle Brechungsindex ist, und κ der Extinktionskoeffizient. Aus dem Brechungsgesetz folgt, dass der berechnete Winkel θ_1 ebenfalls komplex sein muss. Trägt man nun den Reflexionskoeffizienten R , z.B. bei festem Einfallswinkel $\theta_0 = \theta_{SPR} \sim 66^\circ$ und vorgegebenem Brechungsindex des Substrates (hier: $n_1 \sim 1,5$) gegen Realteil und Imaginärteil des Brechungsindex auf, so erhält man Fig. 5b.

Aufgetragen ist in diesem Plot der Reflexionskoeffizient R (von 0 bis 5%) gegen den Realteil des Brechungsindex (von 2

bis 6) und den Extinktionskoeffizient κ (von 0 bis 2,5). Man erkennt: um die Reflektivität zu verringern sollte der Realteil des Brechungsindex zwischen 2 und 6 liegen, und der Extinktionskoeffizient sollte kleiner als 2 sein. Man erkennt also, dass der Extinktionskoeffizient nicht zu groß werden darf, da damit zwar die Extinktion vergrößert wird, aber die Reflektivität sich auch erhöht.

Eine Untergrenze für den Extinktionskoeffizienten κ ergibt sich aus der Überlegung, dass eine Schichtdicke von $1\mu\text{m}$ ausreichen sollte, um 95 % des Lichtes zu absorbieren, was wünschenswert ist um zu gewährleisten, dass die Reflexionsspektren der Sensorfelder nicht wesentlich von denen der Trennmittel bei der Bindungsmessung beeinträchtigt wird. Die bevorzugte Untergrenze ist dann 0.1.

Es ist aus Gründen der leichteren Herstellung wünschenswert, dass das einheitliche Material der Schicht 13.10 ein aufdampfbares Material ist. Vorzugsweise ist es Titan oder Germanium, welche für Substratmaterialien mit Brechungsindex zwischen 1.3 und 1.8, einem Winkelbereich zwischen 55° und 80° , sowie einem Wellenlängenbereich zwischen 500 und 900 nm die gewünschte Reflexion und Extinktion für die gewünschte Polarisationsrichtung aufweisen, wenn eine Schichtdicke von $D=200\text{ nm}$ für die Schicht 13.10 gewählt wird.

Im Zusammenhang mit Titan sei bemerkt, dass dieses Material im Bereich der SPR-Technik als haftungsvermittelndes Material zwischen Gold und Glassubstraten bekannt ist. Allerdings wird es dabei in sehr dünnen Schichten von nur wenigen nm aufgebracht, und gerade deswegen verwendet, weil es keine merkliche Dämpfung der Strahlung bewirkt, von der gewünscht wird, dass sie möglichst vollständig die Goldschicht erreicht, um dort Plasmonen anzuregen. Dies ist im vollkommenen Gegensatz zum Prinzip der vorliegenden Erfindung, ein Material für die Trennmittelschicht zu verwenden, das eine starke Dämpfung bewirkt.

Alternativ zur Verwirklichung der zwei Bereiche in einer
Einschichtstruktur, kann die Erfindung auch in einer
Mehrschichtstruktur ausgeführt werden. Dabei gehört der erste
Bereich 13.8 zu einer ersten, von der Trennmittelschicht
5 13.10 umfassten Schicht 13.11 (siehe Fig. 13c), und der
zweite Bereich 13.7 zu einer zweiten, von der
Trennmittelschicht 13.10 umfassten und von der ersten Schicht
13.11 verschiedenen Schicht 13.12. In der in Fig. 13c
gezeigten Ausführung dient die Schicht 13.11 dazu, die
10 Reflektivität unter 0.5 zu bringen, und die Schicht 13.12
dient dazu, die gewünschte Extinktion zu bewirken. Es sei
angemerkt, dass sich zwischen den Schichten 13.11 und 13.12,
sowie über der Schicht 13.12 noch weitere Schichten befinden
können, was aber der Einfachheit nicht gezeigt ist.

15

Die erste Schicht 13.11 umfasst vorzugsweise Silizium oder
Germanium, welche bei einem für das Substrat zwischen 1.2 und
1.8 liegenden Brechungsindex beide eine niedrige
Reflektivität aufweisen. Die zweite Schicht 13.12 umfasst
20 vorzugsweise Germanium, oder ein Metall, wiederum
vorzugsweise Titan oder Chrom.

Der erste und zweite Bereich 13.8, 13.7, welche die gleiche
Dicke wie die erste bzw. zweite Schicht 13.11, 13.12 haben
25 können, oder eine kleinere, weisen vorzugsweise jeweils eine
Dicke von höchstens 1 μm auf. Dadurch kann die
Trennmittelschicht 13.10 eine Dicke D von 2 μm oder mehr
haben. Bevorzugt wird, dass die Trennmittelschicht 13.10 eine
Dicke D von höchstens 1 μm aufweist.

30

Es wird ferner bevorzugt, dass der zweite Bereich 13.7 eine
Dicke von mehr als 70 nm, vorzugsweise von mehr als 200 nm
aufweist. Der erste Bereich 13.8 soll eine Dicke von mehr als
10 nm, vorzugsweise von mehr als 20 nm aufweisen. Der erste
35 und zweite Bereich zusammen sollen eine Dicke von mindestens
80 nm aufweisen, vorzugsweise von mindestens 100 nm und
besonders bevorzugt von mindestens 200 nm.

Durch die vorliegende Erfindung ist es möglich, Trennmittelschichtdicken D von höchstens $2\text{ }\mu\text{m}$, insbesondere kleiner $1\text{ }\mu\text{m}$ herzustellen. Damit kann wiederum eine Verkleinerung der Sensorfeldabmessungen verwirklicht werden, ohne die eingangs genannten Probleme der Blasenbildung oder Unterätzung. Die Form der Sensorfelder kann dabei beliebig gewählt werden, z.B. rechteckig (wie in Fig. 13 angedeutet) oder rund (wie in Fig. 7 gezeigt). Sensorfelder mit einem Durchmesser bzw. einer Diagonalen von $100\text{ }\mu\text{m}$ oder weniger sind realisierbar. Die Sensorfelder haben bevorzugt jeweils eine Flächenausdehnung von kleiner oder gleich $6.2 \times 10^{-4}\text{ cm}^2$.

Die Flächendichte der Sensorfelder kann gegenüber dem Stand der Technik deutlich erhöht werden und beträgt vorzugsweise 250 Felder pro cm^2 oder mehr. Durch die Möglichkeit, kleine Sensorfeldflächen und hohe Flächendichten bereitzustellen, kann eine erfindungsgemäß ausgestaltete Sensoranordnung bei etwa 10000 Sensorfeldern eine Gesamtfläche von kleiner oder gleich 20 cm^2 haben.

Dadurch ist es wiederum möglich eine gegenüber bisherigen Messanordnungen stark verkleinerte Messanordnung zu schaffen, welche zudem mit handelsüblichen optischen Elementen ausgestattet werden kann, d.h. keine Sonderanfertigungen erfordert. Eine solche optische Messanordnung kann dann eine Fläche von $1\text{--}2\text{ m}^2$ und eine Höhe von ungefähr 1 m haben, um bequem auf einem Labortisch oder dergleichen Platz zu finden. Die grundsätzliche Messanordnung kann dann wie in Fig. 2 aufgebaut sein, d.h. neben der Sensoranordnung 2.10 ist ein optisches Mittel, z.B. die Indexanpassungsschicht 2.11 und das Prisma 2.12 vorgesehen, zum Einkoppeln von Strahlung des interessierenden Wellenlängenbereichs in das Substrat der Sensoranordnung durch die erste Oberfläche, mit einem Winkel innerhalb des interessierenden Winkelbereichs, und zum Auskoppeln der von den Sensorfeldern reflektierten Strahlung. Ferner ist eine Strahlungsquelle (nicht abgebildet) vorzusehen, um dem optischen Mittel Strahlung des

vorgegebenen Wellenlängenbereichs zuzuführen, sowie ein Detektor (siehe Fig. 2c), der angeordnet ist, um die aus dem optischen Mittel ausgekoppelte und von den Sensorfeldern reflektierte Strahlung zu erfassen.

5

Sensoranordnungen nach der vorliegenden Erfindung können auf jede geeignete oder gewünschte Art hergestellt werden.

Vorzugsweise geschieht die Aufbringung der Trennmittelschicht durch Aufdampfen, da sich damit dünne Schichten kleiner 1µm

10 in guter Qualität herstellen lassen.

Fig. 6 zeigt schematisch ein Verfahren der Herstellung.

Zunächst wird eine strukturierbare Lackschicht 6.3 auf dem Substrat 6.4 aufgebracht. Dann wird die Lackschicht 6.3

15 mittels Belichtung durch eine geeignete Maske 6.2

strukturiert, um die freien Bereiche zu definieren (Fig. 6a). Danach wird der Lack entfernt, so dass nur an den Stellen der freien Bereiche Lack verbleibt, wie in Fig. 6b gezeigt.

Danach werden ein oder mehr erste Materialien 6.5 zur Bildung

20 des ersten Bereichs (13.8 in Fig. 13) und anschließend eines oder mehr zweiter Materialien zur Bildung des zweiten

Bereichs (13.7 in Fig. 13) aufgedampft, siehe Fig. 6c. In

Fig. 6d ist die Durchführung eines Lift-Off gezeigt, um den an den freien Bereichen befindlichen und beschichteten Lack

25 abzuheben, so dass an den freien Bereichen das Substrat

freigelegt wird. Schließlich erfolgt der Schritt des

Aufbringens einer SPR-geeigneten Schicht 6.6, z.B. aus Gold, zumindest in den freien Bereichen, um die Sensorfelder zu

bilden. Vorzugsweise wird auch die Trennmittelschicht mit der

30 SPR-fähigen Schicht versehen, da dies den Herstellungsablauf

vereinfacht und damit gleichzeitig ein Schutz für die

Trennmittelschicht geschaffen wird.

Als Alternative zu dem beschriebenen Verfahren können die in Fig. 6a und 6b gezeigten Schritte auch durch das Aufbringen einer strukturierten Lackschicht mittels Siebdrucktechnik ersetzt werden, wobei die nachfolgenden Schritte 6c-6e die gleichen bleiben.

Anstatt der bisher beschriebenen Verfahren kann zur Strukturierung auch ein Ätzverfahren eingesetzt werden. Dieses umfasst das Aufdampfen des Trennmittelmateri-
10 homogen über dem ganzen Substrat. Anschließend werden mittels strukturierbarem Lack die späteren Trennbereiche geschützt. Dies kann beispielsweise lithographisch oder durch Siebdruck erfolgen. Danach erfolgt das Freilegen der Sensorfelder durch selektives Ätzen und Ablösen des Schutzlacks.

15

Fig. 7 zeigt Reflektivitätsmessungen für eine Ausführung der Erfindung, bei welcher die Trennmittelschicht durch eine einheitliche Schicht aus Titan oder Germanium gebildet war. Die obere Hälfte zeigt eine Abbildung des Bildes im Detektor
20 (siehe Fig. 2c), wobei die hellen Felder den Sensorfeldern entsprechen, und der schwarze Bereich der Trennmittelschicht. Die mit Gold beschichteten Sensorfelder hatten einen Durchmesser von 110 μm . Die tatsächlich runden Felder erscheinen in der Abbildung oval, was auf eine Verkipfung in der Abbildungsoptik zurückzuführen ist. Der Graph in der
25 unteren Hälfte von Fig. 7 zeigt die Reflektivität entlang der angegebenen Schnittlinie, außerhalb der SPR-Resonanz. Aufgetragen sind Messungen für drei verschiedene Titan Schichtdicken: 10 nm, 20 nm und 100 nm sowie für Germanium in
30 der Dicke 100 nm. Man erkennt, dass eine Trennmittelschichtdicke von 100 nm die geringste Reflektivität bewirkt (ca. 20%), so dass dies eine bevorzugte

Schichtdicke ist, und dass Germanium einen etwas besseren Kontrast liefert als Titan.

- Figur 8 zeigt das Ergebnis konkreter SPR-Messungen an den in Zusammenhang mit Fig. 7 beschriebenen Ausführungen der Erfindung. Gezeigt sind die Ergebnisse von Bindungsexperimenten mit Biosensoren bei denen Biotin auf den Sensorfeldern immobilisiert wurde. Die gestrichelten Resonanzkurven sind in Benetzung mit einem Referenzpuffer entstanden. Die ausgezogenen Kurven sind nach der Inkubation mit Avidin, einem bekannten Rezeptor von Biotin, aufgenommen worden. Die Verschiebung der Resonanzkurven nimmt linear mit der Menge von gebundenen Avidin zu. Überraschenderweise wurde bei den Sensoren mit Titan als absorbierende Schicht ein deutlich höheres Signal gemessen als bei den Sensoren mit Germanium, obwohl der Kontrast mit Germanium besser war (vgl. Fig. 7). Dies ist vermutlich auf eine höhere Biokompatibilität des Titans zurückzuführen.
- Fig. 9 zeigt Reflexionsstärkemessungen für Sensoranordnungen, bei welchen die Trennmittelschicht aus Silizium bestand. Der obere Graph zeigt Ergebnisse gegenüber Luft, d.h. auf der Oberfläche der Sensoranordnung befand sich Luft. Es wurden Sensoren mit 50, 200 und 400 und 800nm Trennmittelschichtdicke hergestellt, und deren Reflexionsspektrum in der SPR-Apparatur zwischen 750 und 850nm vermessen. Es wurden auch Messungen gegenüber Wasser gemacht, d.h. auf der Oberfläche der Sensoranordnung befand sich Wasser, und der untere Graph zeigt das Verhältnis der gemessenen Reflexionsstärken. Man erkennt, dass bei 800nm Si zwar die Reflexion gegenüber Luft unter 10% fällt, aber dann das Verhältnis von Reflexion in Wasser gegenüber der Reflexion in Luft signifikant variiert. Das bedeutet, dass ein Teil des Lichtes durch die gesamte Si-Schicht hindurchdringt und von dort zurückreflektiert wird, aufgrund des geringen Extinktionskoeffizienten von Si. Damit erfüllt

Si nicht die Voraussetzungen der vorliegenden Erfindung für Trennmittelschichtdicken kleiner 1 μm .

Erfindungsgemäß lässt sich jedoch Si in einer
5 Zweischichtstruktur verwenden, bei welcher Si aufgrund seiner geringen Reflektivität als erste Schicht 13.11 verwendet wird (siehe Fig. 13), und ein Material mit geringer Transmission, z.B. Titan als zweite Schicht 13.12 verwendet wird. Man kombiniert also Si und Titan, um sowohl geringe Reflektivität
10 (Si) als auch geringe Transmission (Ti) zu bekommen. Fig. 10 zeigt Reflexionsstärkemessungen für verschiedene Si/Ti-Kombinationen, wobei der obere Graph ähnlich wie in Fig. 9 die Reflexionsstärke gegenüber Luft zeigt, und der untere Graph das Verhältnis zwischen der Reflexionsstärke gegenüber
15 Wasser und gegenüber Luft.

Bei einer gut realisierbaren Schichtdicke für Si von 400nm wurden zusätzlich unterschiedliche Dicken von Ti (20, 70, 200nm) aufgedampft. Zum Vergleich ist auch 200nm Ti alleine
20 eingezeichnet, wobei damit etwa 20% Reflektivität erreicht wird. Man sieht, dass bei der Kombination Si=400nm und Ti=200nm die Reflexion unter 10% fällt, und gleichzeitig das Verhältnis Reflexion in Wasser zur Reflexion in Luft sich nicht ändert.

25 Es ist daher bevorzugt, dass in einer Zweischichtstruktur die Kombination Si=400nm und Ti=200nm gewählt wird, um ein gut realisierbares Schichtsystem zu erhalten, welches im übrigen besonders biokompatibel ist, da Ti eine gute
30 Biokompatibilität hat.

Überraschenderweise zeigte sich bei dünnen Schichten, dass das Verhältnis der Reflektivität der Trennmittelschicht gegenüber Luft und gegenüber Wasser wichtig ist, da dieses
35 Verhältnis als Überlagerung bei der Datenaufnahme der SPR-Spektren beobachtet wird. Variiert dieses Verhältnis über die Wellenlänge, wie z.B. in Fig. 9 für 800 nm Si, so wird später

im SPR Spektrum ein "buckelartiger" Spektralverlauf überlagert, was zu Artefakten bei der Auswertung der SPR Verschiebungen führt.

- 5 Eine weitere Schwierigkeit bei der Miniaturisierung von Sensoranordnungen, neben der Eingangs erwähnten Blasenbildung und der Unterätzung, ist das präzise Aufbringen der zu messenden Proben auf die Sensorfelder, was auch als Spotting bezeichnet wird. Bekannt ist das Absetzen kleiner Tröpfchen
10 mittels Stahlnadeln auf Glas-Objektträger bei sogenannten DNA-Chips.

- Bei den erfindungsgemäßen Sensoranordnungen mit Sensorfeldabmessungen kleiner 100 μm ist aber eine
15 Positionierungsgenauigkeit von besser 10% anzustreben, also kleiner 10 μm . Dies ist bei dem bekannten Spotting von DNA-Chips nicht möglich.

- Gegenüber dem Spotting von DNA-Chips ist weiterhin zu
20 beachten, dass zum Spotting von chemischen Mikroarrays die Eintauchnadeln, z.B. Stahlnadeln eine Verweildauer von einigen Sekunden auf dem Sensorfeld benötigen, damit die Reagenzien in dem Tropfen mit der aktiven Oberfläche abreagieren und nicht etwa elektrostatisch abwandern. Da
25 weiterhin insgesamt einige 1000 Tropfen pro Chip untergebracht werden sollen, und das Spotting in endlicher Zeit beendet sein soll, ist es wünschenswert eine Technik mit hoher Parallelität des Spotting-Geräts zu entwickeln. Das wiederum erfordert, dass die Vorlageplatten aus denen die
30 Tropfen entnommen werden, in höherer Dichte als in den bekannten 384er Platten (Raster 4,5mm) untergebracht sind, weil sonst bei einer Chipgröße von 27x18 mm nur 24 Stahlnadeln benutzt werden könnten.

- 35 Zur Realisierung der gewünschten Positioniergenauigkeit wurden die Toleranzen bei der Fertigung von Nadel und Nadelführung eng gewählt. Fig. 11 zeigt schematisch solche

Nadeln 11.1, die in einem Träger 11.2 mit Bohrungen zur Aufnahme der Nadeln gehalten werden. Die Nadeln werden z.B. durch spanende Bearbeitung und Schleifen hergestellt und die Spitzen 11.3 der Nadeln verjüngen sich auf 100µm Durchmesser.

5 Damit sich die Nadel bei dem Drehvorgang nicht verbiegt, wurde ein harter Werkstoff (Wolframkarbid) gewählt, der üblicherweise zur Werkzeugherstellung benutzt wird. Die Nadelführung 11.2 wurde in der erforderlichen Präzision in Aluminium hergestellt.

10

Um eine hohe Dichte der Kavitäten bzw. Wells in Vorlageplatten zu erreichen, wurde zunächst die Verwendung von 1536er Mikrotiterplatten versucht. Das Resultat ist, dass die Nadeln 12.1 (siehe Figur 12 I) mit der Wandung 12.2 der Kavität einen Kapillarspalt 12.4 ausbilden, der nach einigen Eintauchvorgängen dazu führt, dass die Flüssigkeit 12.3 nicht mehr am Boden der Kavität befindlich ist, sondern in Tröpfchenform 12.5 an der Wandung der Kavität klebt (Bild 12 IC).

20

Eine denkbare Lösung ist es, die Nadel am Schaft dünner zu gestalten, um den Kapillarspalt zu erhöhen, somit den Transfer der Flüssigkeit vom Boden der Kavität auf die Wandung zu vermindern. Dies ist jedoch aufgrund der gewünschten Positionierungsgenauigkeit nicht möglich, da ein dünnerer Schaftdurchmesser zu stärkerer Verbiegung führt.

25

Zum Aufbringen von Flüssigkeitsproben 12.3 auf eine Sensoranordnung (13.1, siehe Fig. 13) mit einer Vielzahl von Sensorfeldern, welche in einem in einer Ebene liegenden Raster angeordnet sind, wird vorgeschlagen die Flüssigkeitstropfen 12.10 (siehe Fig. 12 II) auf eine Anordnung von in einer Ebene liegenden Flüssigkeitsaufnahmebereichen 12.9 aufzubringen. Dies ist eine Form von Umkopieren oder Reformatting. Dabei ist jeder Flüssigkeitsaufnahmebereich 12.9 von einem

35

Flüssigkeitsabstoßungsbereich 12.8 umgeben, der aus einem die Flüssigkeitstropfen abstoßenden Material besteht, so dass Flüssigkeitsproben in Form von Tropfen mit variablem Durchmesser in den Flüssigkeitsaufnahmebereichen 12.9

5 gehalten werden. Die Flüssigkeitsaufnahmebereiche 12.9 sind in einem mit dem Raster der Sensorfelder kompatiblen Raster vorgesehen.

Hierzu können die Flüssigkeiten z.B. mit relativ dicken Nadeln aus den 384er Mikrotiterplatte herausgeholt werden, wobei bei diesen großen Kavitäten der Kapillareffekt noch keine Rolle spielt, und auf eine Glasplatte abgesetzt, die mit Teflon®-Lack umrandete Felder besitzt. Die Flüssigkeit stößt sich von der Teflunumrandung ab und wird in Tropfenform gehalten, wie in Fig. 12 IIA gezeigt.

15 Um die Tropfen 12.10 zu übertragen wird die Anordnung von Übertragungsstiften 12.1 in die Flüssigkeitstropfen 12.10 auf den Flüssigkeitsaufnahmebereichen 12.9 eingetaucht, um die Spitzen 12.6 der Übertragungsstifte zu benetzen. Dabei sind
20 die Übertragungsstifte 12.1 in einem mit dem Raster der Sensorfelder kompatiblen Raster vorgesehen, z.B. dem gleichen Raster oder einem Unterraster. Dadurch ist eine hochparallele Übertragung möglich. Dann werden die benetzten Übertragungsstifte aus den Flüssigkeitstropfen herausgezogen
25 und über die Sensoranordnung bewegt. Schließlich werden die benetzten Übertragungsstifte über den Sensorfeldern abgesenkt, um die Flüssigkeit an den benetzten Übertragungsstiften mit den Sensorfeldern in Berührung zu bringen.

30 Aufgrund der Möglichkeit der Tropfen sich auszudehnen, treten keine Probleme mit Kapillarkräften auf, und aufgrund der Flüssigkeitsabstoßung durch Material 12.8 geschieht eine

vollständige und unproblematische Benetzung der Stifte, die wiederum ausreichend dick sein können, um die gewünschte Positionierungsgenauigkeit zu gewährleisten. Vorzugsweise erheben sich die Flüssigkeitsabstoßungsbereiche 12.8

- 5 gegenüber der Ebene der Flüssigkeitsaufnahmebereiche 12.9 um maximal 200 μm , bevorzugt um nur 100 μm und besonders bevorzugt um nur 30 μm . Es ist damit bevorzugt, dass die Anordnung der Flüssigkeitsaufnahmebereiche möglichst flach ist.

10

15

Ansprüche

1. Sensoranordnung (13.1) mit einem strahlungsleitenden Substrat (13.9), das eine erste und eine zweite
5 Oberfläche (13.2, 13.3) aufweist, wobei die erste Oberfläche (13.2) eine Strahlungsdurchtrittsfläche ist, durch welche Strahlung eines vorgegebenen Wellenlängenbereichs in das Substrat (13.9) eingekoppelt bzw. aus dem Substrat (13.9) ausgekoppelt werden kann,
10 und auf der zweiten Oberfläche (13.3)
- eine Vielzahl von Sensorfeldern (13.4) vorgesehen sind, welche ausgebildet sind, um aus dem Substrat (13.9) kommende Strahlung des vorgegebenen Wellenlängenbereichs, die in einem vorbestimmten Winkelbereich einfällt, zu reflektieren, sowie
15 - Trennbereiche (13.5) zur Trennung der einzelnen Sensorfelder (13.4) von den jeweils benachbarten Sensorfeldern (13.4), wobei die Trennbereiche (13.5) ausgebildet sind aus dem Substrat (13.9) kommende Strahlung des vorgegebenen Wellenlängenbereichs, die in dem vorbestimmten Winkelbereich einfällt, zu
20 absorbieren, um in der an den Sensorfeldern (13.4) reflektierten Strahlung einen Kontrast zwischen den Sensorfeldern (13.4) und den Trennbereichen (13.5) zu erzeugen, wobei die Trennbereiche (13.5) durch eine Trennmittelschicht (13.10) auf der zweiten Oberfläche (13.3) des Substrats (13.9) gebildet sind,
25
dadurch gekennzeichnet, dass
30
die Trennmittelschicht (13.10) zumindest in einem ersten Bereich (13.8), der an die Grenzfläche zwischen der Trennmittelschicht (13.10) und dem Substrat (13.9) grenzt, für aus dem Substrat kommende Strahlung des
35 vorgegebenen Wellenlängenbereichs, die in dem vorbestimmten Winkelbereich einfällt, an der Grenzfläche

zwischen der Trennmittelschicht (13.10) und dem Substrat (13.9) eine Reflektivität kleiner 0,5 bewirkt, und

5 die Trennmittelschicht (13.10) zumindest in einem zweiten Bereich (13.7), der über dem ersten Bereich (13.8) auf der dem Substrat (13.9) abgewandten Seite liegt, für Strahlung des vorgegebenen Wellenlängenbereichs eine Extinktion größer 0,95 bewirkt.

10

2. Sensoranordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der erste und der zweite Bereich (13.7, 13.8) zu einer einheitlichen Schicht (13.10) gehören.

15

3. Sensoranordnung nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass die einheitliche Schicht (13.10) Titan oder Germanium umfasst.

20

4. Sensoranordnung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Bereich (13.8) zu einer ersten, von der Trennmittelschicht (13.10) umfassten Schicht (13.11) gehört, und der zweite Bereich (13.7) zu einer zweiten, von der Trennmittelschicht (13.10) umfassten und von der ersten Schicht (13.11) verschiedenen Schicht (13.12) gehört.

25

5. Sensoranordnung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass die erste Schicht (13.11) Silizium oder Germanium umfasst.

30

6. Sensoranordnung nach einem der Ansprüche 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, dass die zweite Schicht (13.12) Germanium oder ein Metall umfasst, vorzugsweise Titan oder Chrom.

35

7. Sensoranordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass der erste und zweite

Bereich (13.8, 13.7) jeweils eine Dicke (D) von höchstens 1 μm aufweisen.

- 5 8. Sensoranordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass die Trennmittelschicht (13.10) eine Dicke (D) von höchstens 1 μm aufweist.
- 10 9. Sensoranordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass der zweite Bereich (13.7) eine Dicke (D) von mehr als 70 nm, vorzugsweise von mehr als 200 nm aufweist.
- 15 10. Sensoranordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass der erste Bereich (13.8) eine Dicke (D) von mehr als 10 nm, vorzugsweise von mehr als 20 nm aufweist.
- 20 11. Sensoranordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass der erste und zweite Bereich (13.8, 13.7) zusammen eine Dicke (D) von mindestens 80 nm aufweist, vorzugsweise von mindestens 100 nm und besonders bevorzugt von mindestens 200 nm.
- 25 12. Sensoranordnung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass auf dem Substrat (13.1) mindestens 100, vorzugsweise mindestens 1000 Sensorfelder (13.4) angeordnet sind.
- 30 13. Sensoranordnung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorfelder (13.4) jeweils eine Flächenausdehnung von kleiner oder gleich $6.2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2$ haben.
- 35 14. Sensoranordnung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorfelder (13.4) eine Flächendichte von größer oder gleich 250 Felder pro cm^2 hat.

15. Sensoranordnung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass das Substrat (13.9) als flaches Plättchen ausgebildet ist.
- 5
16. Sensoranordnung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass das flache Plättchen eine Gesamtfläche von kleiner oder gleich 20 cm^2 hat.
- 10
17. Sensoranordnung nach einem der vorangegangenen Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Sensorfelder (13.4) eine SPR-geeignete Schicht (13.6) umfassen.
18. Optische Messanordnung, umfassend:
- 15
- eine Sensoranordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 17,
- ein optisches Mittel (2.11, 2.12) zum Einkoppeln von Strahlung des vorgegebenen Wellenlängenbereichs in das Substrat (13.9) der Sensoranordnung durch die erste
- 20
- Oberfläche (13.2), mit einem Winkel innerhalb des vorbestimmten Winkelbereichs, und zum Auskoppeln der von den Sensorfeldern (13.4) reflektierten Strahlung,
- 25
- eine Strahlungsquelle, um dem optischen Mittel Strahlung des vorgegebenen Wellenlängenbereichs zuzuführen, und
- einen Detektor, der angeordnet ist, um die aus dem optischen Mittel ausgekoppelte und von den Sensorfeldern
- 30
- (13.4) reflektierte Strahlung zu erfassen.
19. Verfahren zur Herstellung einer Sensoranordnung nach einem der Ansprüche 1 bis 17, umfassend den Schritt:
- 35
- Bildung einer Trennmittelschicht (13.10) auf dem Substrat (13.9), so dass freie Bereiche entstehen, welche Sensorfelder (13.4) definieren, wobei das

Aufbringen der Trennmittelschicht (13.9) durch Aufdampfen erfolgt.

5 20. Verfahren nach Anspruch 19, umfassend den weiteren Schritt des Aufbringens einer SPR-geeigneten Schicht (13.6) zumindest in den freien Bereichen, um die Sensorfelder (13.4) zu bilden.

10 21. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt zur Bildung der Trennmittelschicht (13.10) umfasst

Aufbringen einer strukturierbaren Lackschicht (6.3) auf dem Substrat (6.4);

15

Strukturieren der Lackschicht (6.3), um die freien Bereiche zu definieren, und Entfernen des Lacks derart, dass nur an den Stellen der freien Bereiche Lack verbleibt

20

Aufdampfen eines oder mehr erster Materialien zur Bildung des ersten Bereichs (13.8) und anschließend eines oder mehr zweiter Materialien zur Bildung des zweiten Bereichs (13.7); und

25

Durchführen eines Lift-Off, um den an den freien Bereichen befindlichen und beschichteten Lack abzuheben, so dass an den freien Bereichen das Substrat freigelegt wird.

30

22. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt zur Bildung der Trennmittelschicht (13.10) umfasst:

Aufbringen einer strukturierten Lackschicht mittel Siebdrucktechnik;

5 Aufdampfen eines oder mehr erster Materialien zur Bildung des ersten Bereichs (13.8) und anschließend eines oder mehr zweiter Materialien zur Bildung des zweiten Bereichs (13.7);

10 Durchführen eines Lift-Off, um den an den freien Bereichen befindlichen und beschichteten Lack abzuheben, so dass an den freien Bereichen das Substrat freigelegt wird.

15 23. Verfahren nach Anspruch 19 oder 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt zur Bildung der Trennmittelschicht (13.10) umfasst:

20 Aufdampfen des Trennmittelmaterials homogen über dem ganzen Substrat (6.4);

 Schützen der späteren Trennbereiche mittels strukturierbarem Lack;

25 Freilegen der Sensorfelder durch selektives Ätzen und Ablösen des Schutzlacks.

30 24. Verfahren nach einem der Ansprüche 20 bis 23, dadurch gekennzeichnet, dass der Schritt zum Aufbringen einer SPR-geeigneten Schicht (13.6) umfasst:

 Aufdampfen einer SPR-geeigneten Schicht (13.6), vorzugsweise aus Gold, auf die freien Bereiche und die Trennmittelschicht.

25. Verfahren zum Aufbringen von Flüssigkeitsproben (12.3) auf eine Sensoranordnung (13.1) mit einer Vielzahl von Sensorfeldern (13.4), welche in einem in einer Ebene
5 liegenden Raster angeordnet sind, umfassend:

Aufbringen von Flüssigkeitstropfen (12.10) auf eine Anordnung von in einer Ebene liegenden Flüssigkeitsaufnahmebereichen (12.9), wobei jeder
10 Flüssigkeitsaufnahmebereich (12.9) von einem Flüssigkeitsabstoßungsbereich (12.8) umgeben ist, der aus einem die Flüssigkeitstropfen abstoßenden Material besteht, so dass Flüssigkeitsproben in Form von Tropfen mit
variablen Durchmesser in den
15 Flüssigkeitsaufnahmebereichen (12.9) gehalten werden, wobei die Flüssigkeitsaufnahmebereiche (12.9) in einem mit dem Raster der Sensorfelder (13.4) kompatiblen Raster vorgesehen sind;

- 20 Eintauchen einer Anordnung von Übertragungsstiften (12.1) in die Flüssigkeitstropfen (12.10) auf den Flüssigkeitsaufnahmebereichen (12.9), um die Spitzen (12.6) der Übertragungsstifte (12.1) zu benetzen, wobei die Übertragungsstifte (12.1) in einem mit dem Raster
25 der Sensorfelder kompatiblen Raster vorgesehen sind;

Herausziehen der benetzten Übertragungsstifte (12.1) aus den Flüssigkeitstropfen (12.10);

- 30 Absenken der benetzten Übertragungsstifte (12.1) über den Sensorfeldern (13.4), um die Flüssigkeit an den benetzten Übertragungsstiften (12.1) mit den Sensorfeldern (13.4) in Berührung zu bringen.

26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass die Flüssigkeitsabstoßungsbereiche (12.8) gegenüber der Ebene der Flüssigkeitsaufnahmebereiche (12.9) eine maximale Erhebung von 200 μm aufweisen, bevorzugt von 100 μm und besonders bevorzugt von 30 μm .
- 5
27. Verfahren nach Anspruch 25 oder 26, dadurch gekennzeichnet, dass die Übertragungsstifte aus Wolframkarbid bestehen.
- 10

Zusammenfassung

Eine Sensoranordnung (13.1) mit einem strahlungsleitenden
5 Substrat (13.9) wird beschrieben, die eine Vielzahl von
Sensorfeldern (13.4) und Trennbereiche (13.5) zur Trennung
der einzelnen Sensorfelder (13.4) von den jeweils
benachbarten Sensorfeldern (13.4) hat. Die Trennbereiche
(13.5) sind durch eine Trennmittelschicht (13.10) gebildet.
10 Die Trennmittelschicht (13.10) bewirkt zumindest in einem
ersten Bereich (13.8), der an die Grenzfläche zwischen der
Trennmittelschicht (13.10) und dem Substrat (13.9) grenzt,
für aus dem Substrat kommende Strahlung an der Grenzfläche
zwischen der Trennmittelschicht (13.10) und dem Substrat
15 (13.9) eine Reflektivität kleiner 0,5, und zumindest in einem
zweiten Bereich (13.7), der über dem ersten Bereich (13.8)
auf der dem Substrat (13.9) abgewandten Seite liegt, eine
Extinktion größer 0,95.

20 Fig. 13b

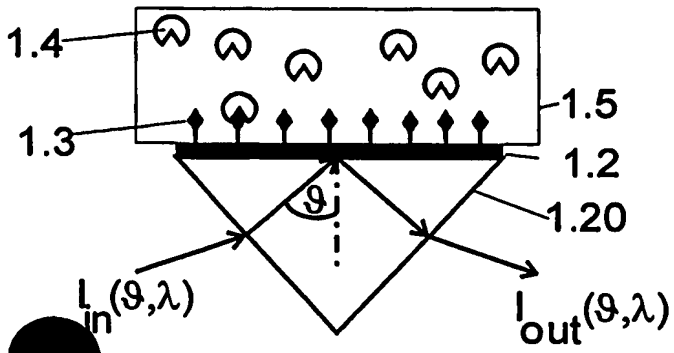


Fig. 1a

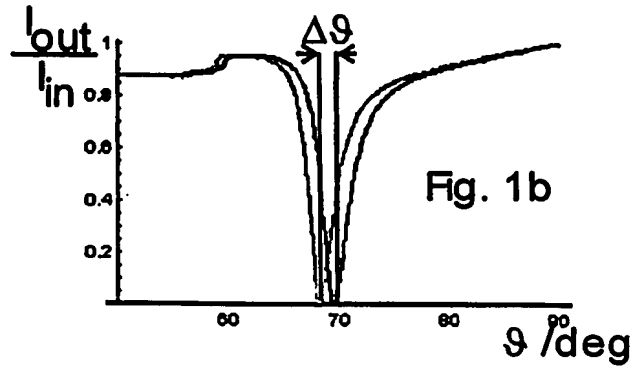


Fig. 1b

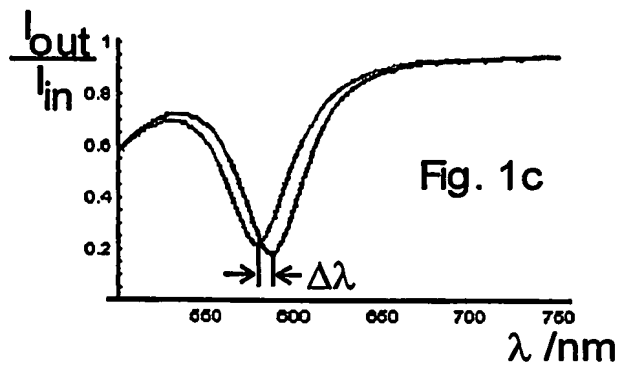


Fig. 1c

2/14

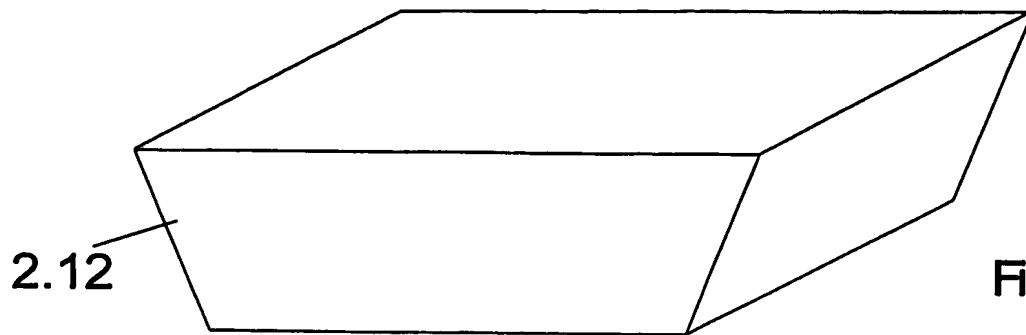
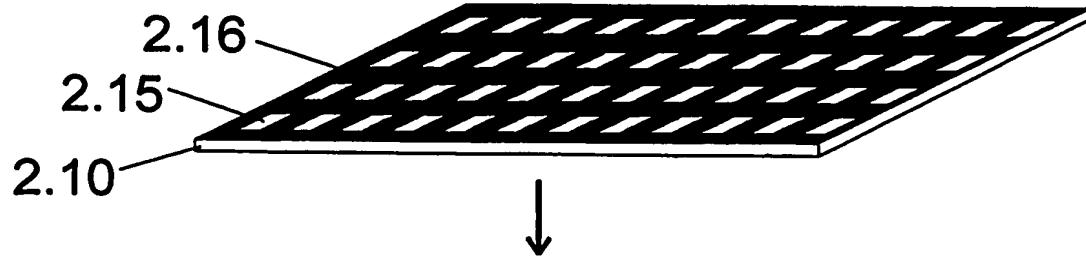


Fig. 2a

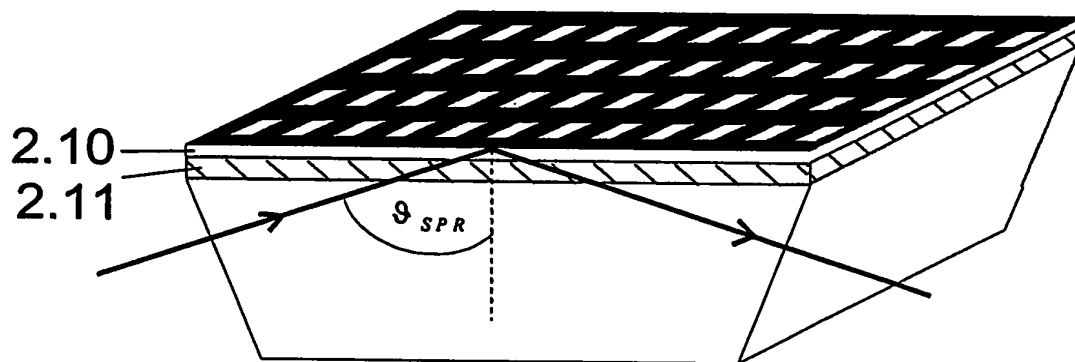


Fig. 2b

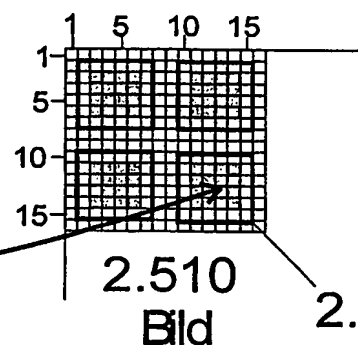
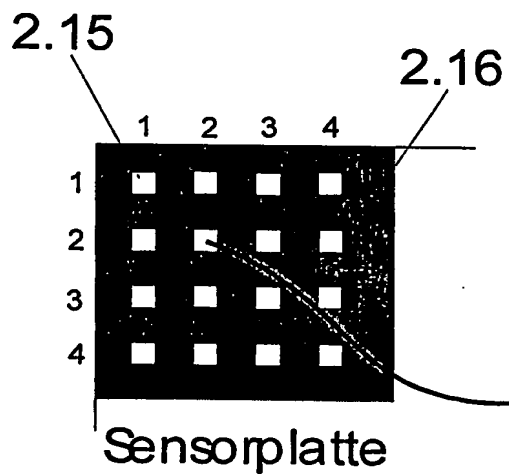


Fig. 2c

2.17

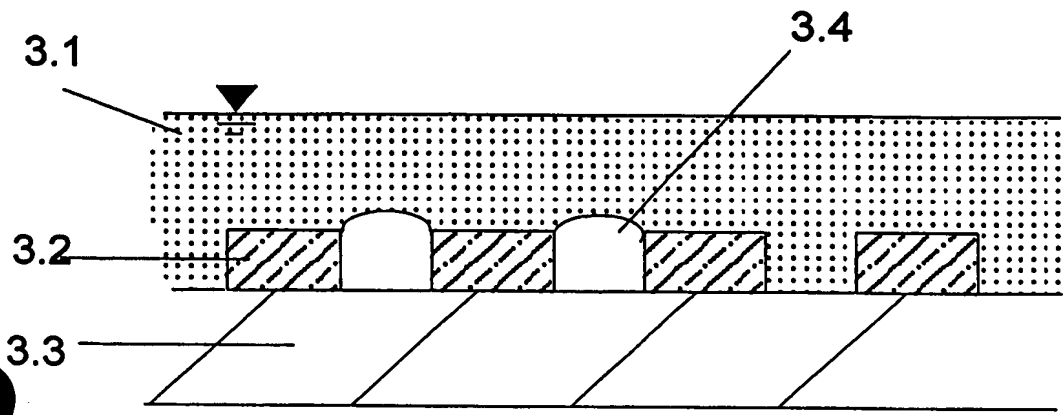


Fig. 3

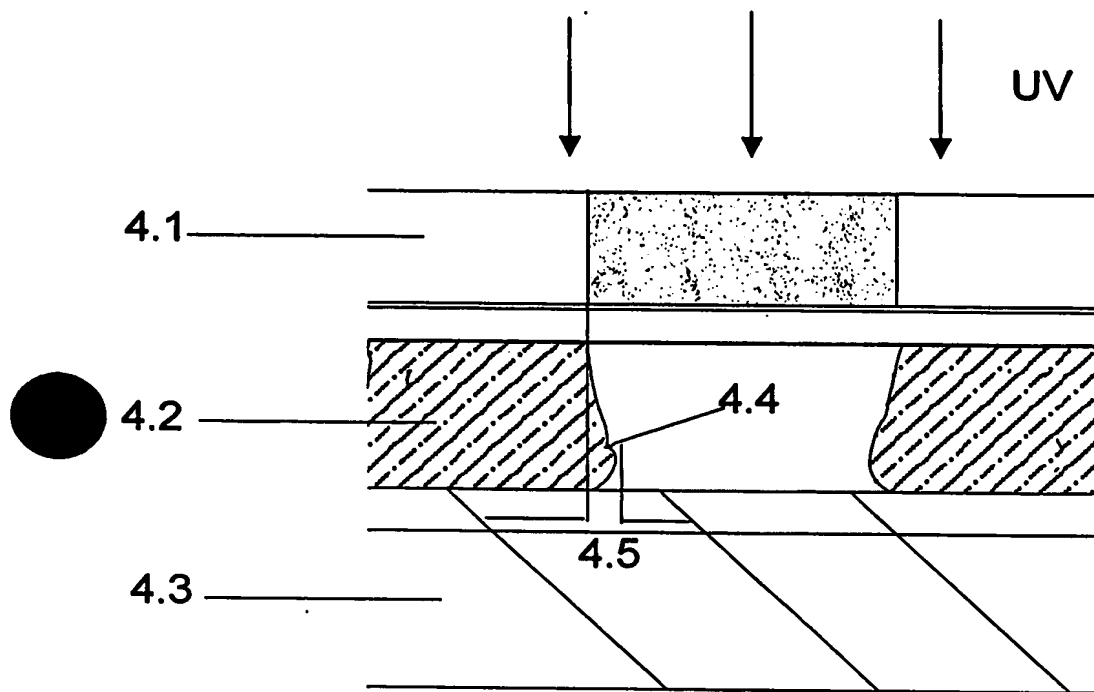


Fig. 4

5/14

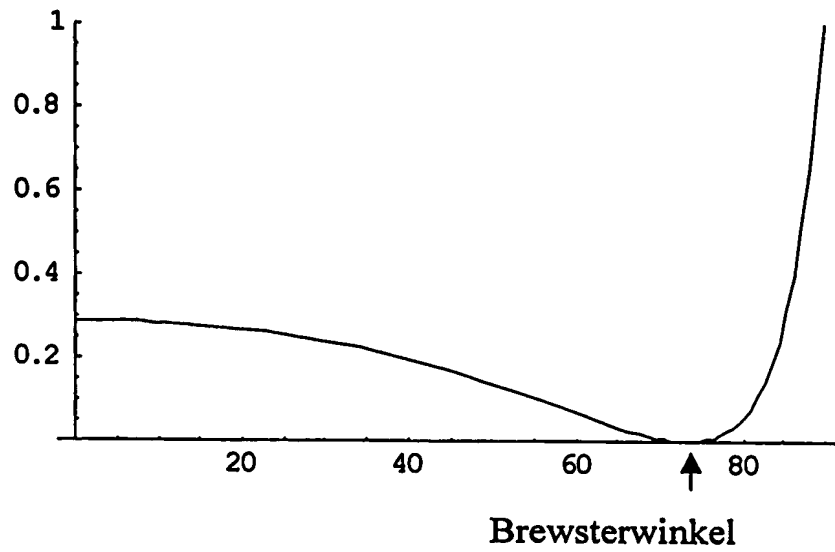


Fig. 5a

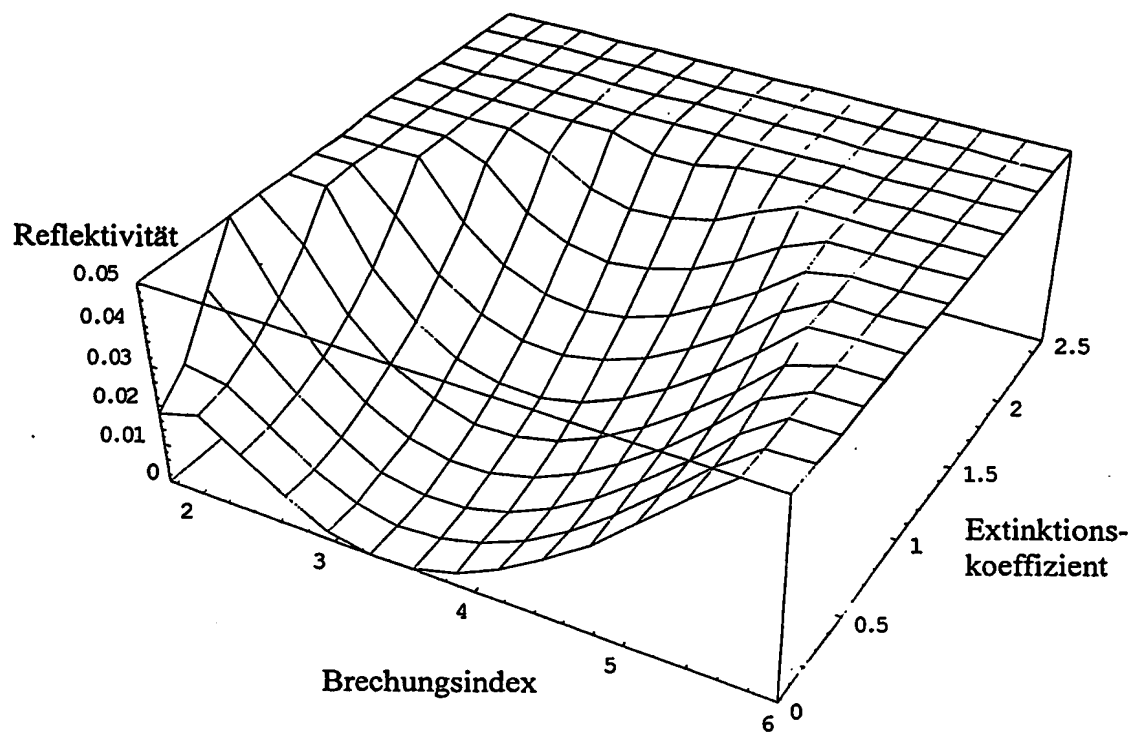


Fig. 5b

6.1

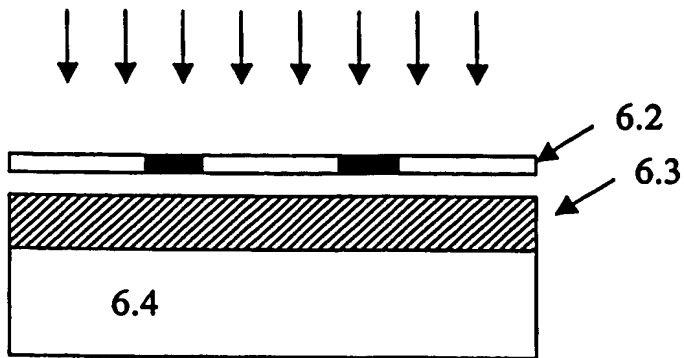


Fig. 6a

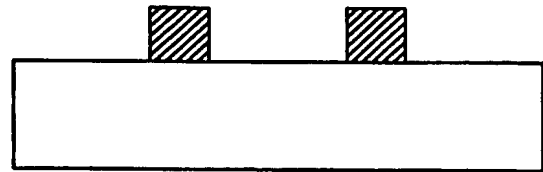


Fig. 6b

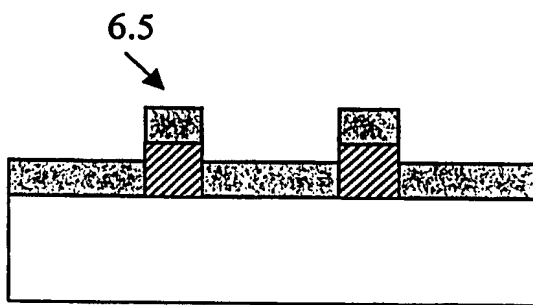


Fig. 6c

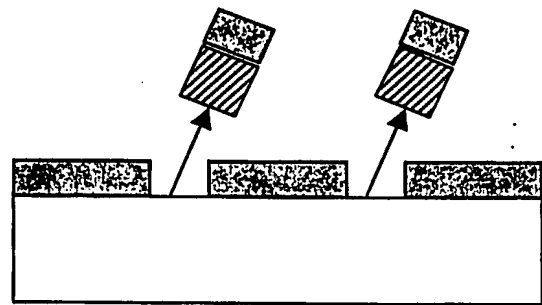


Fig 6d

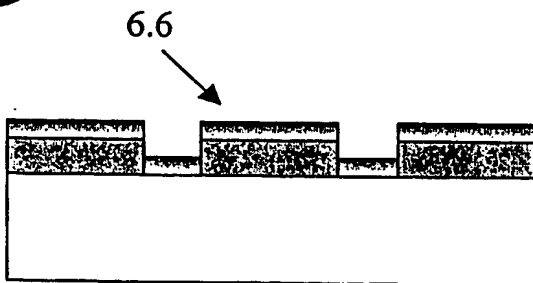


Fig. 6e

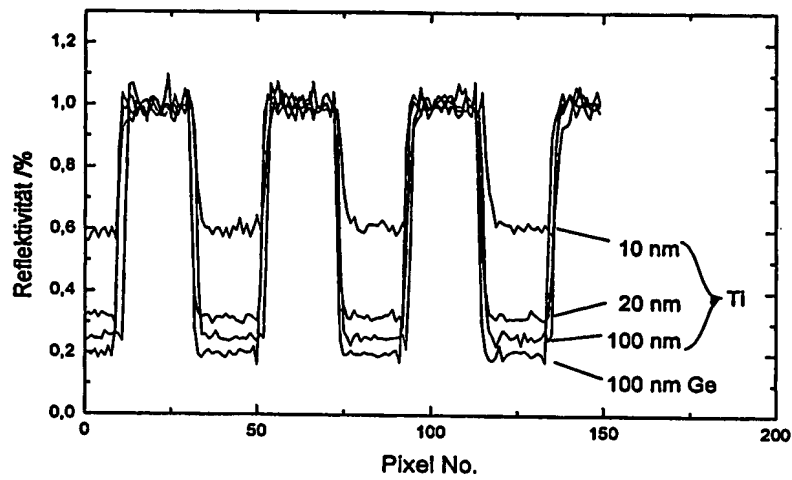
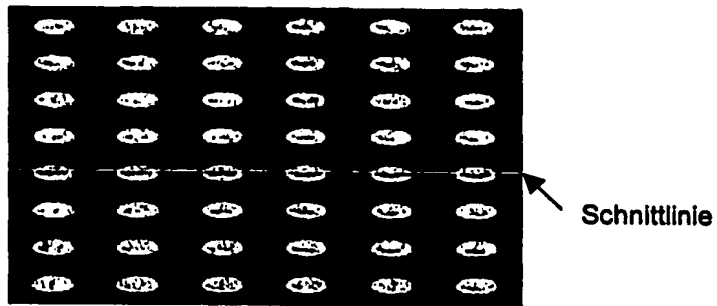


Fig. 7

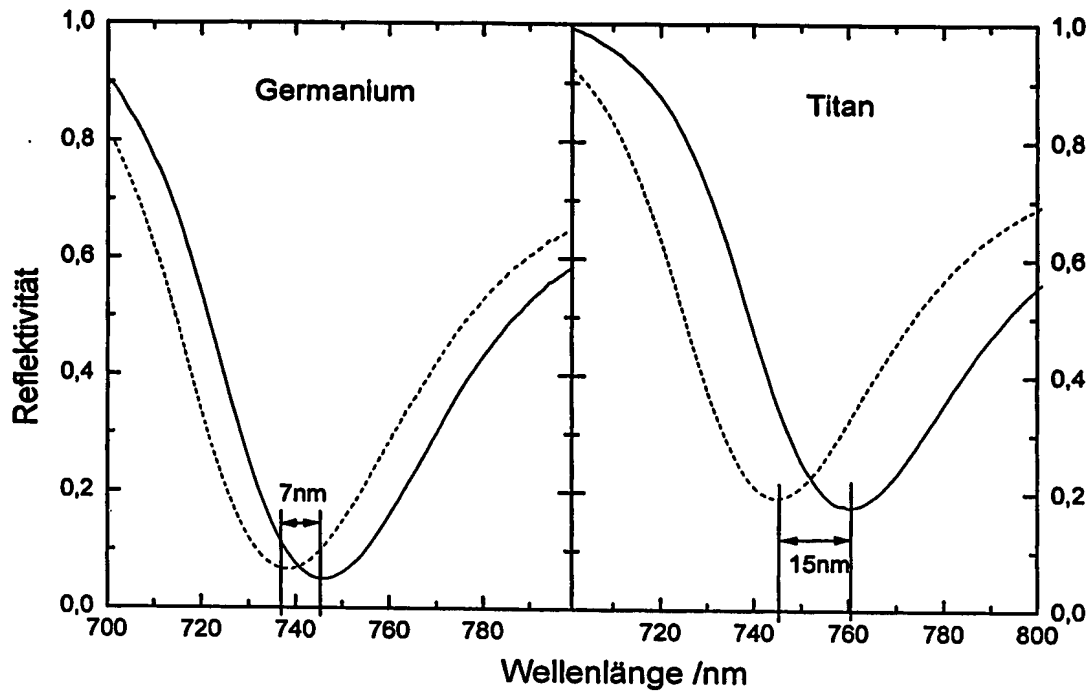


Fig. 8

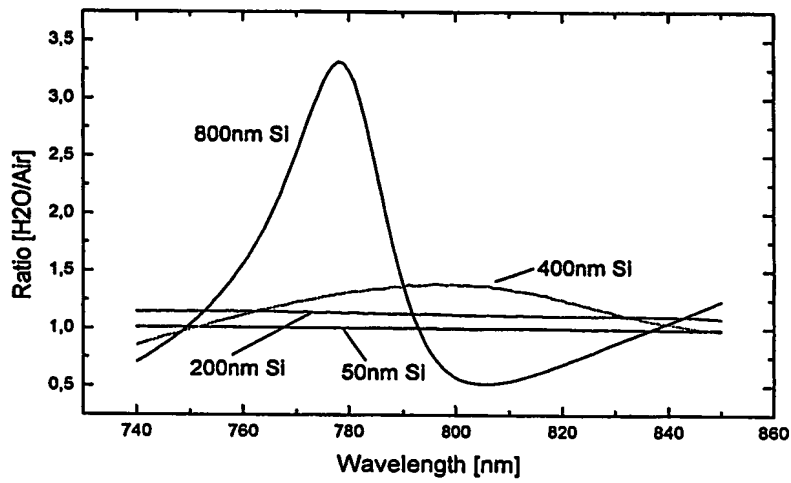
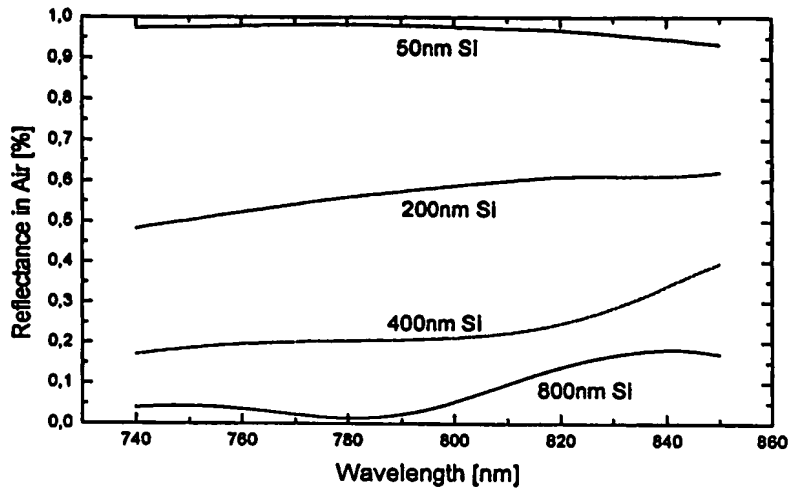


Fig. 9

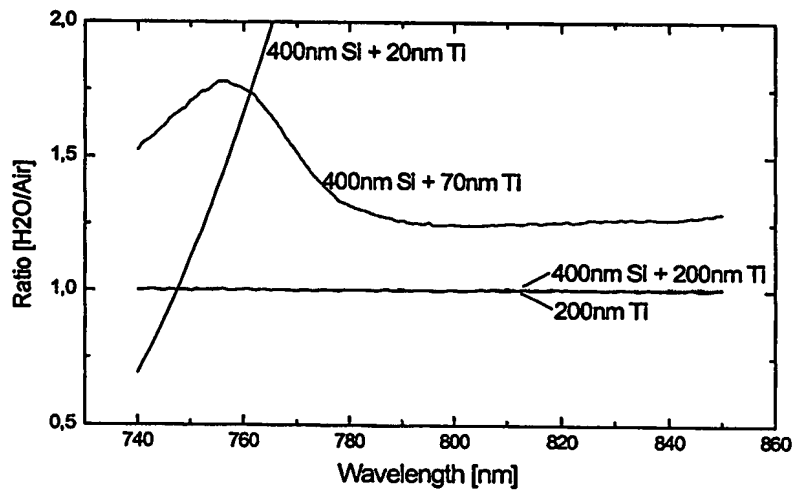
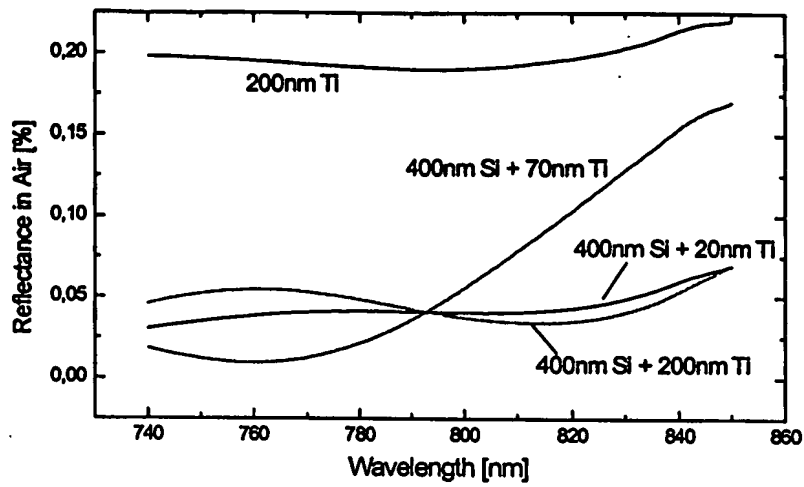


Fig. 10

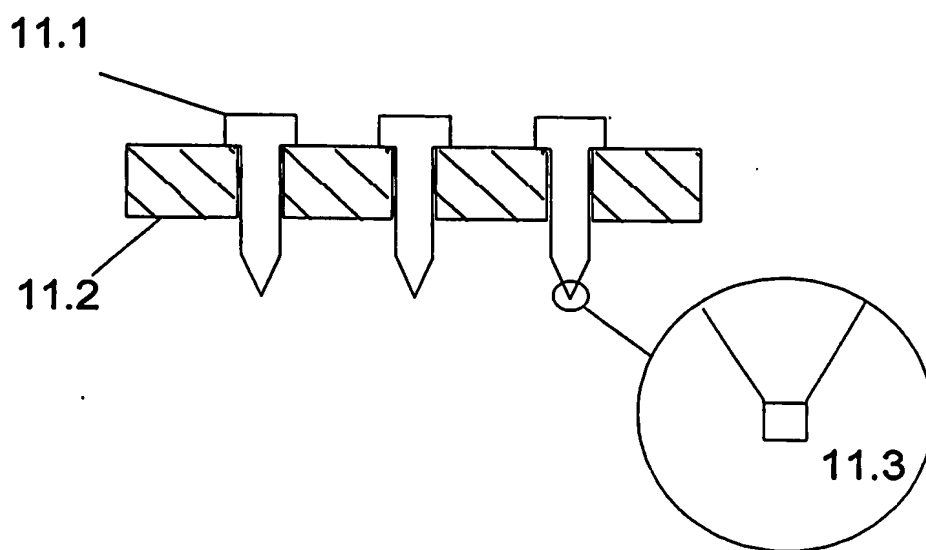


Fig. 11

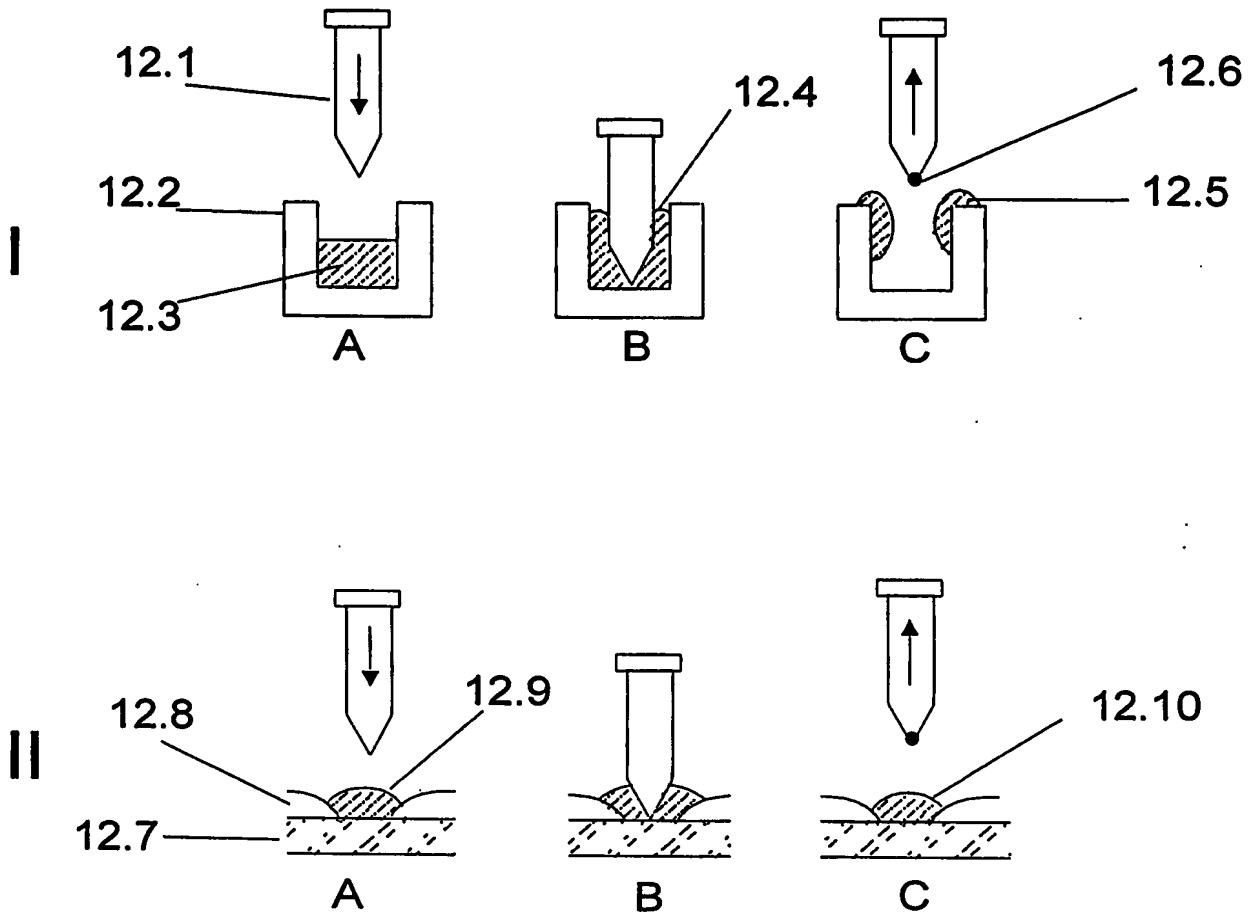


Fig. 12

13/14

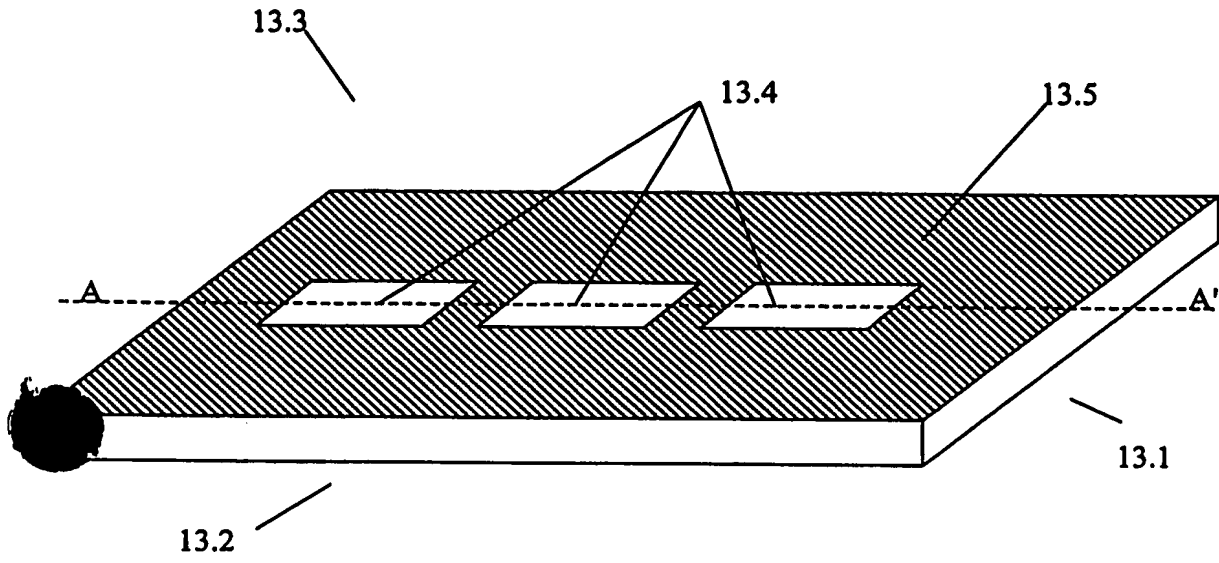


Fig. 13a

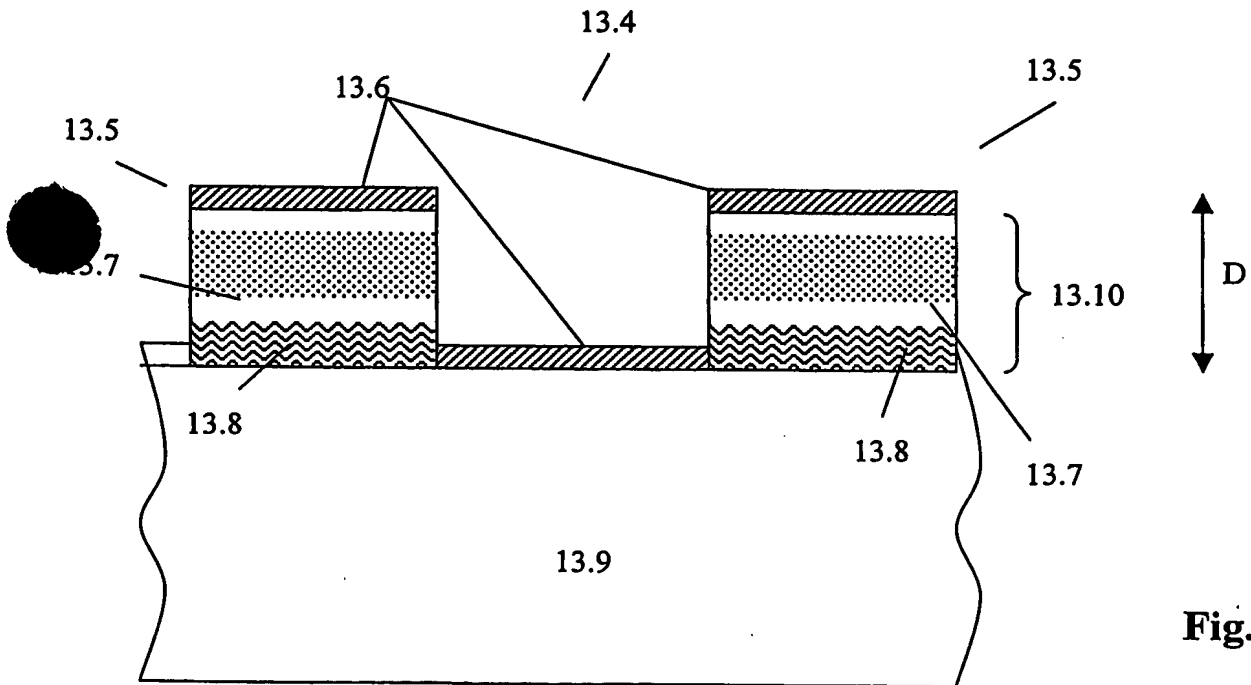


Fig. 13b

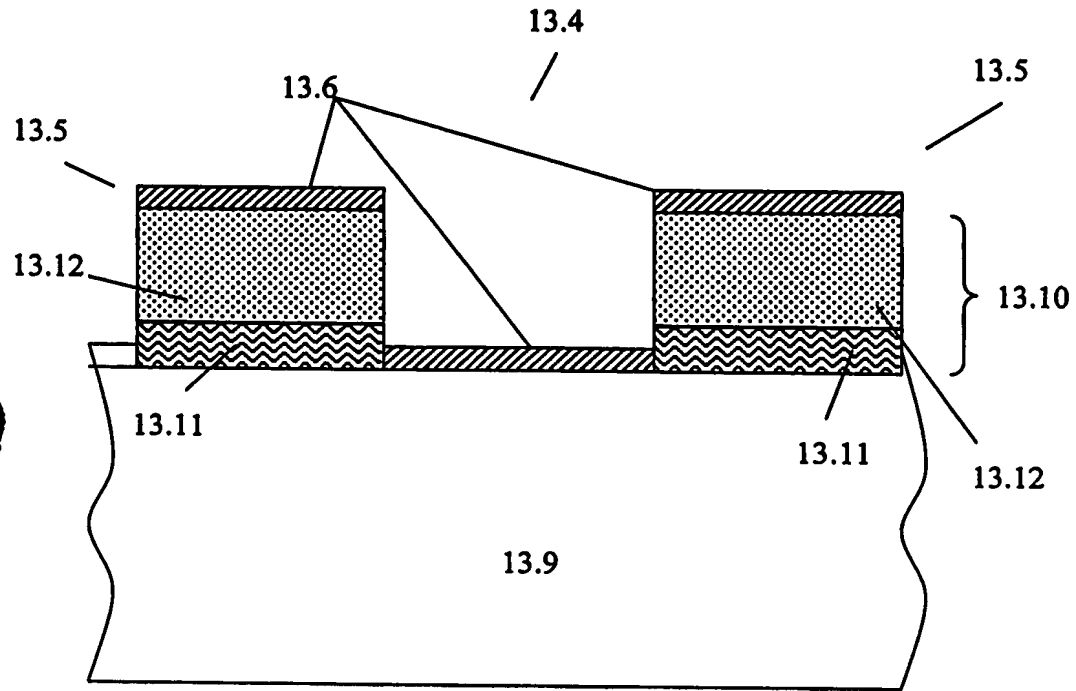


Fig. 13c

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.